

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia Instituut

Siret Niinepuu

Ühe-poti sünteesimeetod kaitstud bensüülhüdrasiinide saamiseks

Bakalaureusetöö

Keemia

12 EAP

Juhendaja: MSc Anton Mastitski

Tartu 2016

Sisukord

Töös kasutatud lühendid.....	4
1. Sissejuhatus	6
2. Kirjanduse ülevaade	7
2.1. Asa-peptiidid ja nende süntees	7
2.2. Meetodid kaitstud hüdrasiinide sünteesis	11
2.2.1 Hüdrasiinide alküülimine.....	12
2.2.2. Redutseeriv alküülimine	14
2.3 Ühe-poti süntees atsetaalidest.....	15
3. Eksperimentaalne osa.....	17
3.1 Aparatuur ja töövahendid	17
3.2 Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused	17
3.3 Sünteeside skeemid.....	18
3.3.1 4-nitrobensaaldiatsetaadi süntees	18
3.3.2 Fmoc-NHNH ₂ ja Z-NHNH ₂ süntees.....	18
3.3.3 Bensoüül- ja asendatud bensoüülhüdrasiinide süntees	19
3.3.4 Üldine bensüülhüdrasiinide sünteesiskeem	19
3.4 Üldised sünteesi meetodid ja ainete iseloomustused.....	20
3.4.1 4-nitrobensaaldiatsetaadi (14) süntees	20
3.4.2 Fmoc-NHNH ₂ (15a) süntees	20
3.4.3 Z-NHNH ₂ (15b) süntees.....	21
3.4.4 Üldine protseduur bensoüülhüdrasiinide saamiseks	21
3.4.5 Üldine protseduur kaitstud bensüülhüdrasiinide saamiseks (19a-19k).....	22
4. Tulemused ja nende arutelu.....	25
4.1 4-nitrobensaaldiatsetaadi süntees (14).....	25
4.2 Fmoc-hüdrasiini (Fmoc-NHNH ₂) (15a) ja Z-hüdrasiini (Z-NHNH ₂) (15b) süntees.....	25

4.3 Bensoüülhüdrasiinide (16-18) süntees.....	26
4.4 Kaitstud bensüülhüdrasiinide (19a-19k) süntees	26
5. Kokkuvõte	28
6. Summary	29
Tänuavaldus	30
Kasutatud kirjandus.....	31
Infoleht	34
Lisa	35

Töös kasutatud lühendid

Ac	atsüül
ACN	atsetonitriil
AcOH	äädikhape
Ah	aminohape
Bn	bensüül
Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül
Bz	bensoüül
Cbz (Z)	bensüüloksükarbonüül
DCM	diklormetaan
DE	dietüüleeter
DIPEA	N,N'-diisopropüületüülamiin
EA (EtOAC)	etüülatsetaat
EtOH	etanool
Fmoc	9-fluorenüülmetüüloksükarbonüül
HOAt	1-hüdrosü-7-asobensotriasool
HOBt	N-hüdroskübensotriasool
IP	infrapunaspektroskoopia
Kt	keemistemperatuur
Me	metüül
PE	petrooleeter
PG	kaitserühm
St	sulamistemperatuur
t-Bu	<i>tert</i> -butüül
TBTU	O-(bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat

TEA	trietüülamiin
TFA	trifluoroäädikhape
THF	tetrahüdrofuraan
TMR	tuumamagnetresonants
TLC	planaarkromatograafia (Thin layer chromatography)
Vv	veevaba

1. Sissejuhatus

Hüdrasiini derivaadid on leidnud endale väga laia kasutusala. Näiteks kasutatakse neid pestitsiidide ja efektiivsete ravimitena, mille abil saab ravida Parkinsoni tõve ja turbekuloosi. Lisaks sellele on nad väga väärtuslikud lähteained orgaanilises sünteesis, olles lähtematerjaliks nii heterotsükliiliste ühendite kui ka asapeptiidide sünteesis.

Bioloogiliselt aktiivsed peptiidid on potentsiaalsed ravimi kandidaadid, kuid paraku on nende rakendamine tihti raskendatud bioloogilise lagunemise tõttu. Seepärast viiakse peptiidide struktuuriga läbi erinevaid modifikatsioone, millega saavutatakse stabiilsuse kasv seejuures bioloogilist aktiivsust võimalikult vähe alandades. Üks võimalus on peaahelas süsiniku asendamine lämmastiku aatomiga. Sellise modifikatsiooniga saadud aminohapet nimetatakse asa-analoogiks.

Paraku ei ole aminohapete asa-analoogid stabiilsed, mistõttu sünteesitakse neid vastavate prekursorite kujul. Nende ainete põhiliseks sünteesimeetodiks on olnud redutseeriv alküülimine, millel on mitmeid puudusi. Nimelt teeb selle meetodi keeruliseks konjugeeritud C=N sidemega ühendite redutseerimine ja alküülühma sisestamine kahes etapis. Seni kaitstud bensüülhüdrasiinide saamiseks on lähtutud bensaldehüüdidest ning hüdrasooni redutseerimisel on kasutatud vesinikuga redutseerimist kõrgendatud rõhul Pd katalüsaatoril. Selline reaktsioon nõuab spetsiaalset aparatuuri ning kallist väärismetalli katalüsaatorit. See tekitab vajaduse mugavama sünteesimeetodi järgi, mis võimaldaks vältida Pd-katalüütilist vesinikuga redutseerimist ning kasutada vastavaid bensaldehüüde kaitstud kujul.

Käesolev töö on pühendatud mugavama kaitstud bensüülhüdrasiinide sünteesimeetodi arendamisele.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Asa-peptiidid ja nende süntees

Peptiidideks nimetatakse peptiidsidemetega ridamisi ühendatud aminohappejääke. Peptiide jaotatakse aminohappe jääkide arvu järgi oligopeptiidideks (2-20 ah), polüpeptiidideks (21-50 ah) ning valkudeks (>50 ah). Kvalitatiivse koostise järgi eristatakse homomeerseid (ainult ah) ja heteromeerseid (ka mittevalgulised osad) peptiide. Struktuuri põhjal ainult amiidsidemetega või teist liiki sidemetega (ester-, disulfiidsidemed) peptiidideks. (Jakubke, 1985)

Peptiidid ja polüpeptiidid täidavad organismis bioloogiliselt tähtsaid rolle. Näiteks vasopressiin, mida toodetakse ajus hüpotaalamuses, on neuroaktiivne peptiid-hormoon, mis reguleerib organismis vee- ja naatriumisisaldust (Holmes, 2004). Lisaks sellele mõjutavad peptiidid ka emotsionaalset sfääri (nt. endorfiinid) ning reguleerivad organismisest hormoonide sünteesi. (Dalayoun, 1993). Veel üheks heaks näiteks on kasvuhormoon, mis koosneb 191 aminohappejäägist, stimuleerib kasvu ning reguleerib valgusünteesi luudes, lihastes ja kõhres. Tema organismisest sünteesi reguleerib aga 14 aminohappejäägist koosnev somatostatiin, olles inhibeeriva toimega. (Jakubke, 1985)

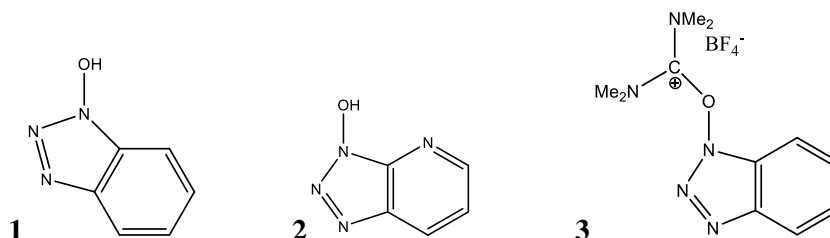
Peptiidide sünteesi teostatakse lahuses või tahkel kandjal. Sünteesi põhimõte seisneb korduvas kaitserühma eemaldamises ning uue aminohappe sidumises (Lloyd-Williams, 1997).

Peptiidi süntees lahuses vajab alguses kahte kaitstud aminohapet, millest üks on N- ja teine C-kaitstud. Pärast amiidsideme moodustumist kaitstud dipeptiid eraldatakse ja puhastatakse. Seejärel eemaldatakse puhastatud produkti N-terminuselt kaitserühm ning seotakse järgmise N-kaitstud aminohappega. Nõnda korratakse eelnevaid etappe korduvalt, kuni on saavutatud soovitud peptiid. Tähtis on mainida, et lahuses sünteesitud peptiid vajab puhastamist iga sünteesietapi järel. (Lloyd-Williams, 1997)

Oluliselt mugavam on teostatada peptiidide sünteesi Merrifield'i poolt väljatöötatud tahkefaasi meetodil (Merrifield, 1963). Selle meetodi puhul kinnitatakse aminohape mittelahustuva tahkele kandjale. Peptiidiahelat pikendatakse korduvate etappidena soovitud tulemuseni. Ka sel sünteesimeetodil on puudusi. Esiteks, vaheühendite eraldamine on võimatu ning teiseks kogunevad madala lahustuvusega vaheühendid samuti tahkele kandjale. (Lloyd-Williams, 1997)

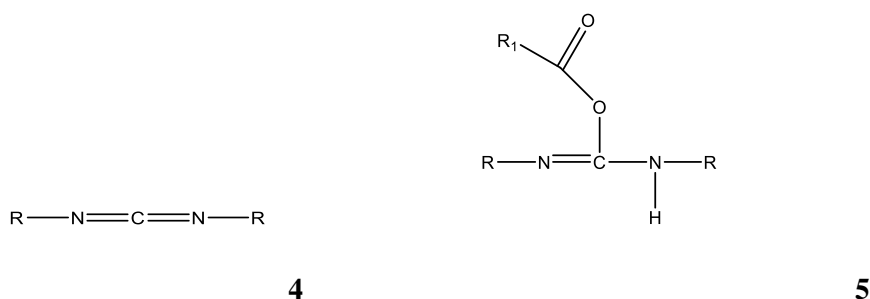
Peptiidsünteesis kasutatakse ortogonaalset kaitsestrateegiat. See seisneb selles, et kasutatavad kaitserühmad on erinevates tingimustes eemaldatavad. Boc-kaitserühm on eemaldatav happega (TFA) ning Fmoc-rühm aluselistes tingimustes (piperidiin). Enim rakendust leidnud ortogonaalsete kaitserühmade kombinatsioonid on Fmoc/t-Bu (Atherton, 1978) ning Boc/Bn (Merrifield, 1963; Lloyd-Williams, 1997).

Peptiidsideme tekitamiseks vajab aminohappe karboksüülrühm aktiveerimist. Selleks kasutatakse erinevaid võtteid. Üheks nendest on karboksüülrühma muutmise aktiivseks estriks. Nii kasutatakse hüdroksübensotriasoolist (HOBT) (**Skeem 1, 1**) ning hüdroksüasabensotriasool (HOAT) (**Skeem 1, 2**) saadud estreid. (Lloyd-Williams, 1997) Aktiivestrite saamiseks kasutatakse kõige sagedamini TBTU-d (**Skeem 1, 3**), HATU-d, HBTU-d jne.



Skeem 1. Hüdroksübensotriasool (HOBT) (**1**), 1-hüdroksü-7-asabensotriasool (HOAT) (**2**) ja HOBT põhinev urooniumsool (TBTU) (**3**) (Lloyd-Williams, 1997).

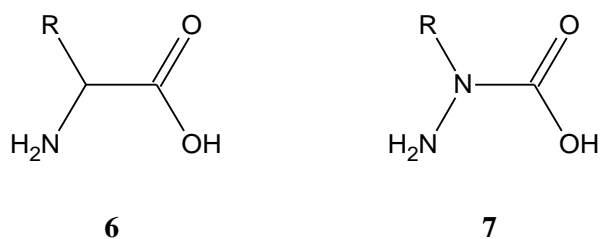
Lisaks kasutatakse ka karbodiimiide (**Skeem 2, 4**) (Rich, 1979), mis annavad vaheühenditena O-atsüüluurea derivaadi (**Skeem 2, 5**). Karbodiimiidide kasutamist piirab mõningal määral tugev allergeensus, kantserogeensus (Williams, 1981) ja kõrvalproduktide tekkimine (Lloyd-Williams, 1997).



Skeem 2. Karbodiimiid (**4**) ja O-atsüüluurea derivaat (**5**) (Lloyd-Williams, 1997).

Bioloogiliselt aktiivsed peptiidid on hinnatud ravimikandidaadid (Mastitski, 2014). Näiteks Zoladex, mille põhitoimeaineks on α -peptiidide hulka kuuluv gosareliin, on meditsiinis kasutusel eesnäärme- (Furr, 1983) ja rinnavähi ravis (Melendez, 2004). Gosareliin pärsib organismis testosterooni tootmist, mis omakorda aeglustab vähirakkude kasvu (Bolla, 1997). Toidulisandina kasutatav Suprefort sisaldab naturaalseid kõhunäärme peptiide, mis normaliseerivad kõhunäärme tööd taastades vajalike peptiidide defitsiiti ning toetades proteiinisünteesi rakkudes (Mashkovsky, 1993). Paraku takistab peptiidsete ravimite ulatuslikku rakendust suhteliselt kiire bioloogiline lagunemine (Gentilucci, 2010) ning väike membraani läbimisvõime (Busnel, 2005). Tõstmaks peptiidide proteolüütilist stabiilsust ja bioloogilist aktiivsust, viiakse struktuuris läbi erinevaid modifikatsioone (Mastitski, 2014). Üheks võimaluseks peptiidide stabiilsuse tõstmiseks on looduses mitteesinevate aminohapete sisestamine peptiidiahelatesse. Selliste aminohapete moodustatud amiidsidemed ei ole ensüümide jaoks tuttavad ja nende lagundamine on oluliselt raskendatud (Cheloha, 2014).

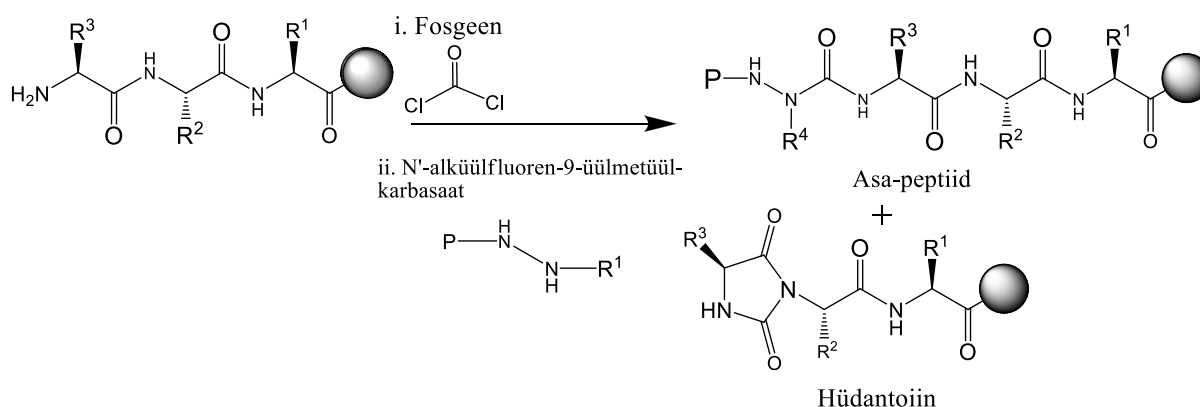
Üks võimalikke modifikatsioone on naturaalse aminohappe (**Skeem 3, 6**) üleviimine α -analoogiks (**Skeem 3, 7**), sest α -süsiniku aatomi asendamine lämmastiku aatomiga suurendab stabiilsust biodegradatsiooni vastu (Mastitski, 2015; Quibell, 1993; Busnel, 2005; Boeglin, 2005). Siiski on α -asa-aminohapetega töötamisel suur puudus. Nimelt ei ole nad stabiilsed ning lagunevad (dekarboksüleeruvad) iseeneslikult. Seetõttu ongi vaja kasutada vastavaid prekursoreid, et α -aminohappeid peptiidi ahelasse soovitud kujul viia.



Skeem 3. α -aminohape (**6**) ja ebapüsiv α -asa-aminohape (**7**) (Mastitski, 2015).

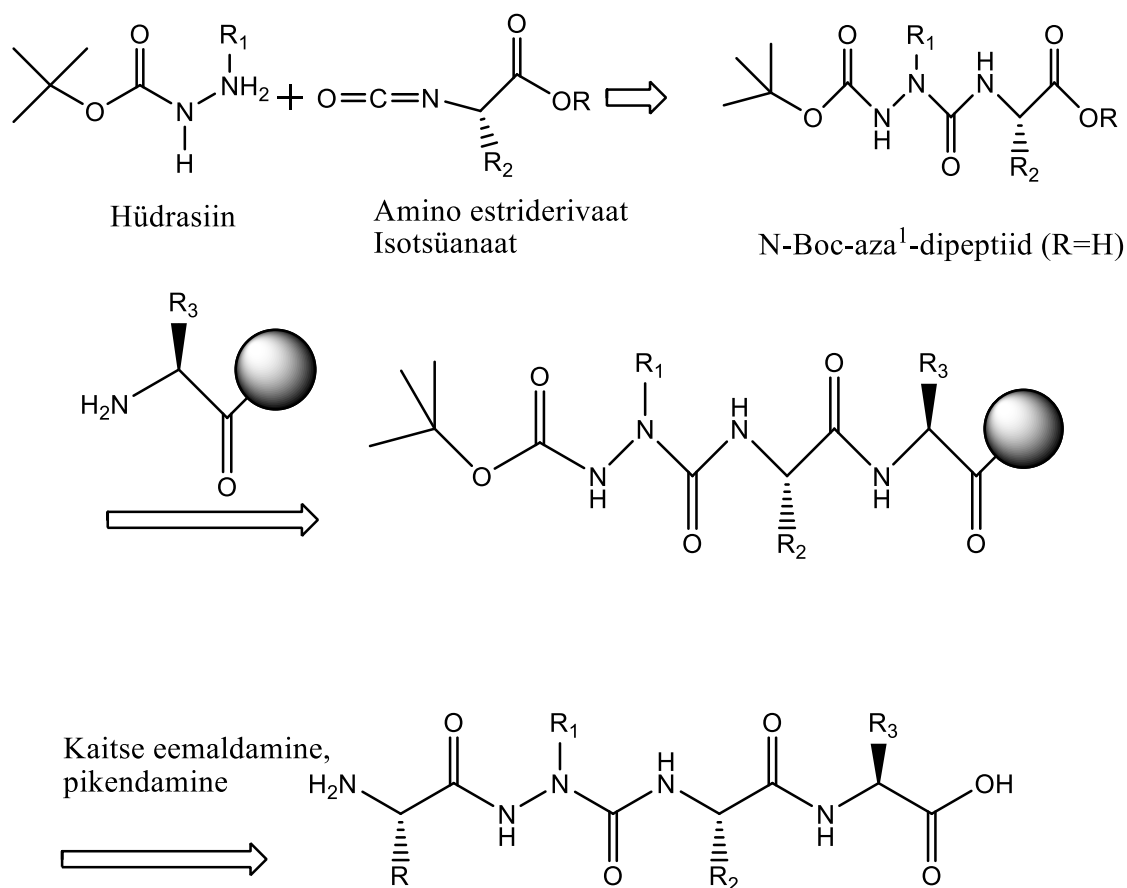
α -aminohapete asendused on tõstnud bioloogiliselt aktiivsete peptiidanaloogide aktiivsust, selektiivsust ning omadusi, näiteks toimeaine pikenemine ja metaboolse stabiilsuse kasv (Busnel, 2005). Arvestades neid omadusi, on α -peptiidid hinnatud retseptorligandide, ensüümide inhibiitorite ning ravimitena (Proulx, 2011).

Nagu eelnevalt mainitud, on asa-aminohapped sünteesitavad stabiilsete prekursorite kujul, milleks on kaitstud alküülhüdrasiinid. Asa-aminohappe sisestamiseks peptiidi ahelasse on välja töötatud mitmeid kombineeritud strateegiaid lähtudes hüdrasiinide ja peptiidide keemiast (Zhang, 2003; Lee, 2002). Üheks variandiks on asa-aminohapete klooranhüdriidide kasutamine (Boeglin, 2005). Kuigi see fosgeeniga toimuv reaktsioon annab soovitud asa-peptiidi, on suureks probleemiks kõrvalproduktide teke. Üheks põhilisandiks on hüdantoiin, mis moodustub molekulisisesel nukleofiilse ataki tulemusel (**Skeem 4**).



Skeem 4. Asa-peptiidide süntees üle atsüükloriidi (Boeglin, 2005).

Lisaks eelnevalt mainitud klooranhüdriidsele meetodile on leidnud kasutust ka aminorühma muutmine isotsüanaadiks (Nowick, 1992). Vajalik isotsüanaat saadakse aminohappe estri reageerimisel fosgeeniga. Genereeritud isotsüanaat reageerides hüdrasiiniga annab ester-rühmaga kaitstud dipeptiidi (**Skeem 5**). (Melendez, 2004)



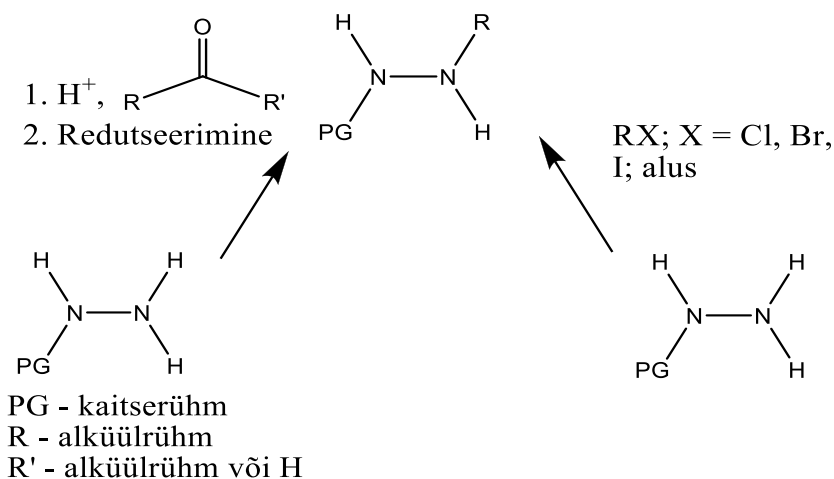
Skeem 5. Isotsüanaatne meetod asa-peptiidide sünteesiks (Melendez,2004).

Lisaks eelpool mainitud rakendusele modifitseeritud peptiidide sünteesis, leiavad asendatud hüdrasiinid rakendust pürasoolide jm lämmastikku sisaldavate heterotsükliliste ühendite prekursoritena. Ning samuti on nad komponentideks ravimites ning agrookeemilistes vahendites. (Ragnarsson, 2001)

2.2. Meetodid kaitstud hüdrasiinide sünteesis

Hüdrasiinide sünteesi raskendab kahe ekvivalentse lämmastikuaatomi eristamine ning reaktsioonide selektiivsuse tagamine (Garcia-Ramos, 2012). Hüdrasiini ja tema derivaatide sünteesiks on läbi aegade kasutatud erinevaid meetodeid, mille seas saab eristada sünteesi üle diasooniumsoolade, N-nitrosoamiinide ning asa-ühendeid (Ragnarsson, 2001).

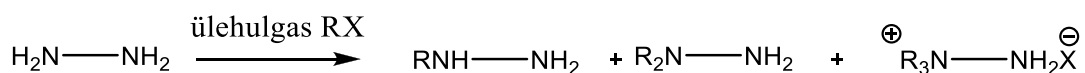
Kaitstud hüdrasiinide sünteesis kasutatakse aga tavaliselt kahte põhilist meetodit: otsest alküülimist alküülhalogeniididega ning redutseerivat alküülimist, kus esimeses etapis saadakse karbonüülühendist ja hüdrasiinist hüdrasoon, mis teises etapis redutseeritakse (**Skeem 6**) (Ragnarsson, 2001).



Skeem 6. Kaks peamist sünteesirada N'-kaitstud N-alküülhüdrasiini derivaadi saamiseks (Mastitski, 2015).

2.2.1 Hüdrasiinide alküülimine

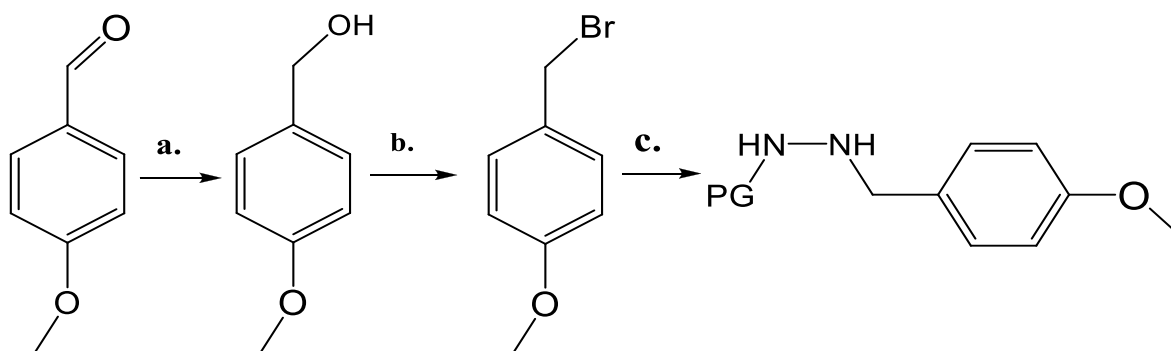
Hüdrasiinide alküülimine alküülhalogeniididega annab tavaliselt mono-, di- ja triasendatudprodukte, kus asendusühm on sama lämmastiku aatomi küljes (**Skeem 7**). Diasendatud produktide tekke põhjuseks on alküülosa kasv kaitstud hüdrasiinis. See suurendab hüdrasiini nukleofiilsust, suunates monoalküülitud ühendeid minema üle dialküülitud ühendiks. (Mastitski, 2015)



X = halogeen (enamasti bromiid); R = alküül

Skeem 7. N'-kaitstud hüdrasiini sünteesiskeem (Ragnarsson, 2001).

Saadud alküülimise segude lahutamine komponentideks on sageli tülikas ja seega jääb alküülimine tihti tööstuslikuks meetodiks. Kuid sellele vaatamata omab otsene alküülimine ka märgatavat tähtsust erinevate hüdrasiinide laborisünteesidel. Heaks näiteks saab tuua asatürosiini prekursorite sünteesimist otsese alküülimise teel (**Skeem 8**) (Mastitski, 2015).

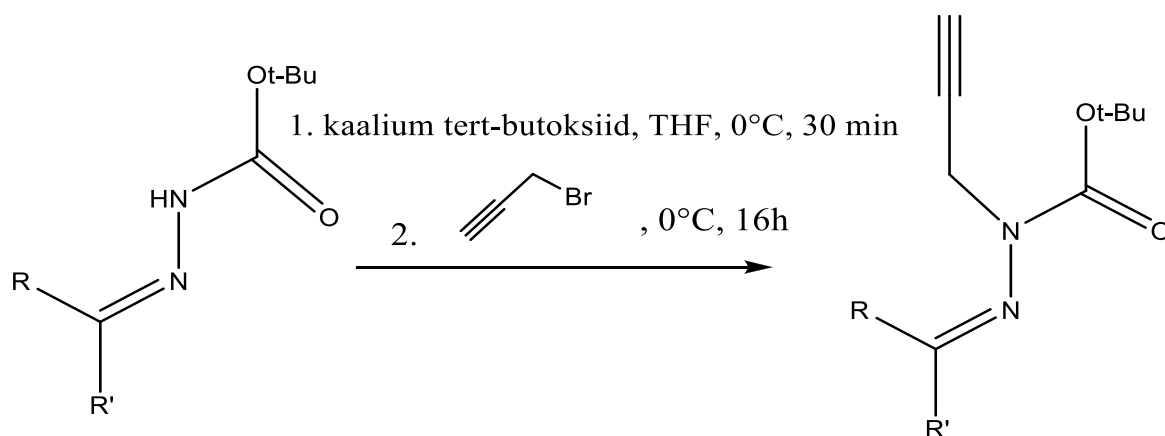


Reaktsiooni tingimused: **a.** 1 ekv NaBH_4 , CH_3OH , 2h; **b.** 0,77 ekv PBr_3 , kuiv DCM, 1 ekv TEA, 0°C , 1,5h; **c.** 3 ekv PG-NHNH₂, 0,1 M ACN lahus, 12h keetmist.

Skeem 8. N-kaitstud asa-Tyr-OCH₃ prekursori süntees (Mastitski, 2015).

Solvendi ja aluse valik sõltub hüdrasiini kaitserühmast ning selle iseloomust. Näiteks tertsiaarsed amiinid (TEA või DIPEA) on sobivad Boc- ja Cbz-kaitserühmaga ka kõrgematel temperatuuridel, samal ajal toimuks alusetundliku Fmoc-rühma eemaldumine. Nõrgad alused, nagu püridiin ja selle derivaadid, sobivad ülejäänud kaitserühmadega. Solvendi valik mängib olulist rolli alküülimisreaktsioonis (Mastitski, 2015).

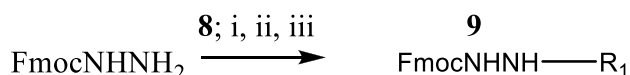
Lisaks otsesele hüdrasiinide alküülimisele asa-aminohapete prekursorite sünteesis on efektiivselt rakendatud ka hüdrasoonidest saadud anioonide alküülimist alküülhalogeniididega (**Skeem 9**) tugeva aluse juuresolekul (Bourguet, 2010; Sabatino, 2009).



Skeem 9. Alküülhalogeniidiga alküülimine (Garcia-Ramos, 2012).

2.2.2. Redutseeriv alküülimine

Hüdrasiinide alküülimise puhul on põhiliseks probleemiks polüalküülimise produktide teke. Seda probleemi saab vältida kasutades redutseeriva alküülimise meetodit (**Skeem 10**), mille puhul toimub alküülrühma sisestamine 2 etapis.



- i. Aldehüüd või ketoon **8a-8c**, EtOH, püstjahutiga keetmine
- ii. NaBH_3CN , AcOH, THF, toatemperatuur, 1h; EtOH 78°C, 1h



- i. Aldehüüd või ketoon **8a-8c**, EtOH, püstjahutiga keetmine
- ii. NaBH_3CN , AcOH, THF, toatemperatuur, 1h; EtOH 78°C, 1h
- iii. $\text{CCl}_3\text{C}(\text{OtBu})\text{NH}$, DCM, toatemperatuur, 24h



- i. Aldehüüd või ketoon **8a-8c**, EtOH, püstjahutiga keetmine
- ii. H_2 Pd(OH)₂, 100 Psi, THF, 16h



- i. Varjatud aldehüüd **8d**, p-TsOH, EtOH 78°C, 2h
- ii. NaBH_3CN , AcOH, THF, toatemperatuur, 1h; EtOH 78°C, 1h

Skeem 10. Redutseeriv alküülimine (Boeglin, 2005).

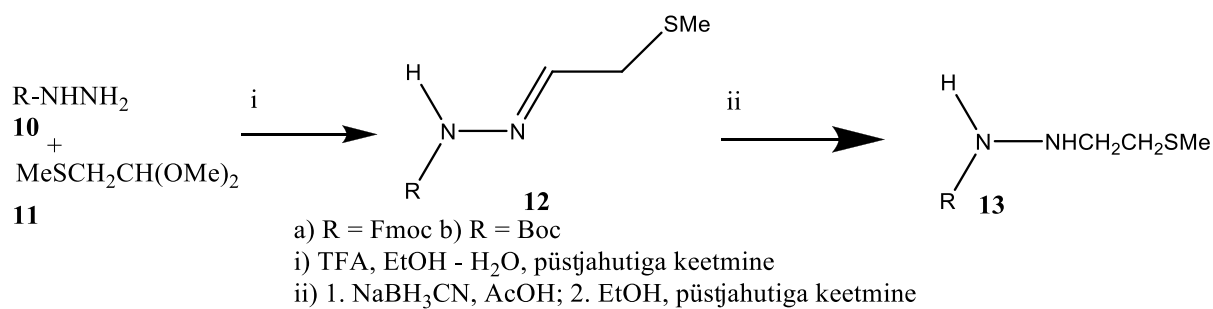
Asa-aminohapete prekursorite sünteesimiseks kasutataksegi põhiliselt redutseerivat alküülimist (Boeglin, 2005). Redutseeriva alküülimise lähteained (eeskätt aldehüüdid) on väga tundlikud oksüdatsiooni suhtes, mistõttu on neid raske säilitada. Paremaks säilitamiseks kaitstakse aldehüüdrühmi peamiselt atsetaalide moodustamise teel. Hüdrasoonide redutseerimiseks kasutatakse $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{AcOH}$ kombinatsiooni, mis aga ei tööta delokaliseeritud $\text{C}=\text{N}$ sidemega hüdrasoonide puhul. Nende redutseerimine on keeruline ja reeglina vajab Pd-katalüütilist vesinikuga redutseerimist kõrgendatud rõhul (Boeglin, 2005; Melendez, 2004). Eelnevalt mainitud probleemid tekitasid vajaduse sünteesimeetodi järgi, mis võimaldaks kasutada karbonüülühendeid kaitstud kujul, ei vajaks vaheetapis kondensatsiooni produktide eraldamist ja väldiks Pd-katalüütilist vesinikuga töötlemist. Sellise meetodi arendamisele on pühendatud ka see töö.

2.3 Ühe-poti süntees atsetaalidest

Nii nagu otsene alküülimine, omab redutseeriv alküülimine rea puudusi. Nimelt ei saa seda meetodit kasutada nukleofiilset rühma või elektronegatiivset heteroaatomit sisaldavate ühendite puhul. Nukleofiilse rühma olemasolu destabiliseeriks reaktsioonis osalevat aldehydi ning võimaldaks tema kondensatsiooni iseendaga. See võibki olla üheks põhjuseks, miks seni polnud võimalik sünteesida mitmeid asa-aminohapete (nt. asa-metioniini) prekursoreid. Lisaks raskendab kõigi aldehydide säilitamist nende kiire oksüdatsioon õhuhapniku toimel. Seega karbonüülühendite pikemaajaliseks säilitamiseks kasutatakse nende kaitsmist, millest kõige levinum on atsetaalkaitse. Kaitse mahavõtmine toob aga lisaks ühe sünteesi etapi.

Võttes arvesse eelmainitud probleeme oli arendatud ühe-poti sünteesimeetodit, kus esimeses etapis keedeti kaitstud Fmoc- ja Boc-hüdrasiini (**Skeem 11, 10a-10b**) ja 2-metüültioatsetaldehydi dimetüülatsetaali (**11**) ekvimolaarseid segusid 90% etanooli lahuses katalüütilise koguse TFA juuresolekul (**Skeem 11**) (Mastitski, 2014). Reaktsiooni võtmefaktoriks oli hoolikalt lisatud katalüsaatori kogus. Boc-hüdrasiinile lisati 0,05 mooli ning Fmoc-hüdrasiinile 0,13 mooli TFA-d. Kusjuures TFA koguse kahekordistamisel langesid hüdrasooni saagised alla 50% ning puudumisel reaktsiooni ei toimunud. Järgnev hüdrasooni redutseerimine viidi läbi toatemperatuuril samas kolvis kasutades NaBH_3CN ning äädikhapet. (Mastitski, 2014). Reaktsiooni lõppedes neutraliseeriti happe ülejääk küllastatud naatriumvesinikkarbonaadiga (NaHCO_3) ning tekkinud boori kompleksid lagundati reaktsioonisegude keetmisel etanoolis (Calabretta, 1991).

Selliste tingimuste juures saavutati asa-metioniini prekursorite saagisteks 51% ja 57% vastavalt Fmoc- ja Boc-kaitserühmade korral. Võrreldes kaheetapilise prekursorite sünteesiga, kus toimus vahepealne hüdrasooni (**Skeem 11, 12b**) eraldamine, oli Boc-kaitstud ühendi saagiseks 60%, mis on kõigest 3% rohkem ühe-poti meetodist. Fmoc-kaitserühma puhul oli kaheetapilise sünteesi saagis poole suurem ühe-poti meetodist. Selline erinevus võis olla põhjustatud Fmoc-ühendite (**Skeem 11, 12a**) kehvast lahustumisest etanoolis või toimunud kõrvalreaktsioonide tõttu (Mastitski, 2014).



Skeem 11. Asa-metioniini Fmoc- ja Boc-kaitstud prekursori ühe-poti süntees (Mastitski, 2014).

Käesolevas töös arendati kirjeldatud ühe-poti sünteesimeetodit edasi ja laiendati selle kasutusala. Selleks testiti erinevaid lähteaineid ning uuriti teiste happeliste katalüsaatorite mõju reaktsioonile.

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Aparatuur ja töövahendid

* TMR spektrite mõõtmiseks kasutati Bruker AC 200P (Spectroscopin AG, Switzerland).

* TLC Silica gel 60 F₂₅₄ Merck KGaA.

* Kolonnkromatograafias kasutati SIGMA-ALDRICH'i Silica gel high purity grade 70-230.

* Tööks kasutati Lach-Ner, Merck, Sigma-Aldrich või Reahim solvente ja keemilisi reaktiive.

3.2 Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused

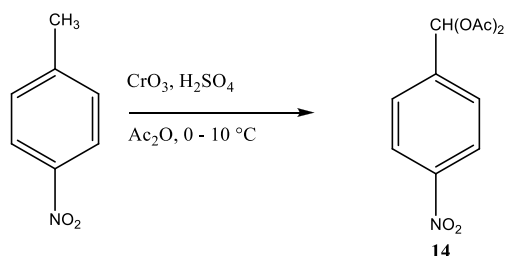
Viide: [29]

Aine	M [g/mol]	Kt [°C]	St [°C]	Tihedus [g/ml] (20°C)	N _D ²⁰
ACN	41,05	81,3..82,1	-46..-44	0,786	1,344
Ac ₂ O	102,09	139,8	-73,1	1,082	1,390
BH ₃ ·THF (1M)	85,94	-65	-108	0,898	-
Boc-NHNH ₂	132,16	63..65	39..42	1,020	-
Bz-NHNH ₂	136,15	-	112..114	-	-
CrO ₃	99,99	250	197	2,700	-
CDCl ₃	120,38	60,9	-64	1,500	1,444
CHCl ₃	119,37	61,15	-63,5	1,489	1,446
DCM	84,93	39,8-40	-97	1,325	1,424
DMSO	84,17	189	-	1,190	1,476
EA	88,11	76,5-77,5	-84	0,902	1,372
EtOH	46,07	78	-114	0,789	1,360
Fmoc-Cl	258,70	393,9	62..64	1,288	1,611
Heksaan	86,18	69	-95	0,659	1,375
H ₂ SO ₄	98,08	337	13	1,840	1,418
KMnO ₄	158,03	-	240	2,703	1,590
Metüülbensoaat	136,15	199,6	-12,5	1,083	1,516

Metüül-3-nitrobensoaat	181,45	302	94..96	1,310	1,554
NaCl	58,44	1413	801	2,16	1,544
NaHCO ₃	84,0		-	2,20	1,334
Hüdrasiinhüdraat (N ₂ H ₄ ·H ₂ O)	32,04	114	2	1,02	1,431
PE	82,2	42..62	< -73	0,653	1,370
p-nitrotolueen	137,14	238,3	52..54	1,103	1,538
p-TsOH	172,20	140	38	1,24	1,563
THF	72,11	66	-108,4	0,889	1,407
(dimetoksümetüül)-benseen	152,19	199,7	87..89	1,014	1,489

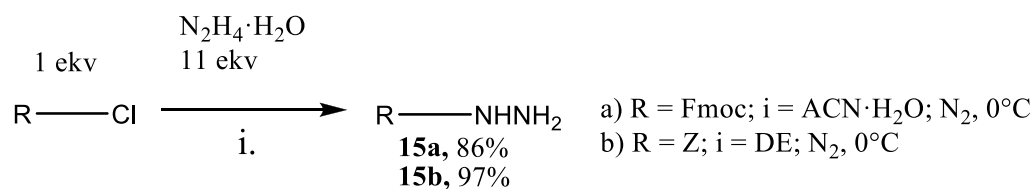
3.3 Sünteeside skeemid

3.3.1 4-nitrobensaaldiatsetaadi süntees



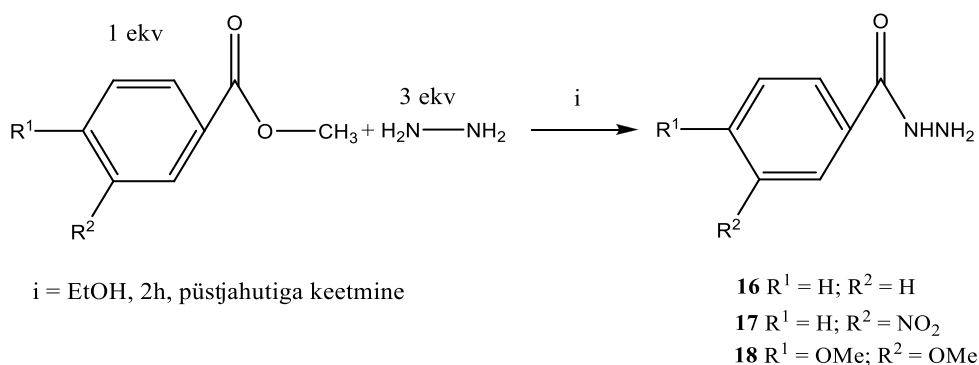
Skeem 12. 4-nitrobensaaldiatsetaadi sünteesiskeem (Nishimura, 1943).

3.3.2 Fmoc-NHNH₂ ja Z-NHNH₂ süntees



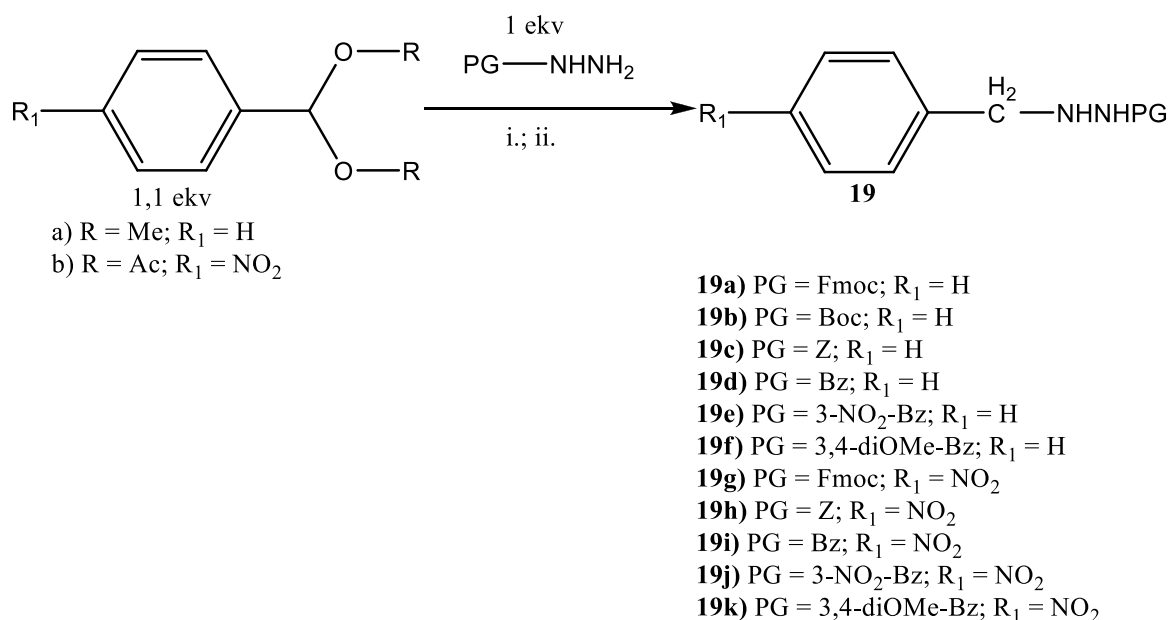
Skeem 13. Fmoc-NHNH₂ (**15a**) ja Z-NHNH₂ (**15b**) sünteesiskeem.

3.3.3 Bensoüül- ja asendatud bensoüülhüdrasiinide süntees



Skeem 14. Bensoüül- ja asendatud bensoüülhüdrasiini sünteesiskeem.

3.3.4 Üldine bensüülhüdrasiinide sünteesiskeem



i. EtOH-H₂O, p-TsOH·H₂O, püstjahutiga keetmine;

ii. 1. dest THF, 3 ekv BH₃·THF (1M); 2. EtOH, püstjahutiga keetmine

		PG-NHNH ₂					
		PG = Fmoc	PG = Boc	PG = Z	PG = Bz	PG = 3-NO ₂ -Bz	PG = 3,4-diOMe-Bz
R' = H	R'' = Me	95%	39%	46%	72%	78%	65%
		19a	19b	19c	19d	19e	19f
R' = NO ₂	R'' = Ac	68%		55%	60%	28%	57%
		19g		19h	19i	19j	19k

Skeem 15. Bensüülhüdrasiinide sünteesiskeem ja saagised.

3.4 Üldised sünteesi meetodid ja ainete iseloomustused

3.4.1 4-nitrobensaaldiatsetaadi (14) süntees

Viide: Nishimura, 1943

Esmalt valmistati CrO_3 lahus. Selleks jahutati etaanhappeanhüdriidi (45 ml) jäävannil umbes 15 minutit. Keeduklaasi kaaluti CrO_3 ($m=10,08$ g; $n=0,101$ mol) ning lisati ettevaatlikult jahutatud äädikhappe anhüdriidi lahusele samal ajal segu segades. Peale lisamist eemaldati segu jäävannilt ning jäeti segama, kuni kogu CrO_3 oli lahustunud.

Seati üles katseks vajalik aparatuur: 250 ml kolmekaelaline kolb, mille ühes avas oli automaattermomeeter, teises tilklehter. Kaaluti p-nitrotolueeni ($m=5,003$ g; $n=0,036$ mol) ning kanti lehtri abil kolbi ja lisati 40 ml etaanhappeanhüdriidi. Kolb asetati jäävannile segu jahutamiseks. Lisati kontsentreeritud H_2SO_4 ($V=8$ ml). Segu hoiti kogu aeg isopropüülalkohol/vedel N_2 jahutusvannil reaktsiooni tugeva eksotermia tõttu. Tilklehtri abil lisati aeglaselt CrO_3 lahus äädikhappeanhüdriidis p-nitrotolueeni segule nõnda, et temperatuur segus ei tõuseks üle 10°C . Vajadusel lisati jäävanni segule täiendavalt vedelat lämmastikku. Peale kroomilahuse lisamist segati segu $5-10^\circ\text{C}$ juures 2h. Temperatuuri kontrolliti iga 10-15 min järel.

Pärast 2h möödumist valati segu 500 ml keeduklaasi, mis oli 1/3 osas täidetud purustatud jääga. Seejärel lisati vett, kuni kogu ruumala on 500-600 ml. Aine eraldati filtrimise teel, pesti veega ning küllastatud NaHCO_3 lahusega, ja etanooliga. Saadud ainet kuivatati öö jooksul õhu käes. Tulemuseks saadi 3,39 g TLC järgi puhast ainet, mis moodustab 37% teoreetilisest saagisest.

^1H TMR (200 MHz; CDCl_3) δ : 2,18 (br s; 6H; $2\times\text{CH}_3$); 7,75 (s; 3H; $\text{Ar(H)} + \text{CH}$); 8,27 (s; 2H; Ar(H)). ^{13}C δ : 20,7 (CH_3); 88,4 (CH); 123,9; 127,9; 142,1; 148,7 (Ar(C)); 168,8 (C=O).

3.4.2 Fmoc-NHNH₂ (15a) süntees

Viide: Boeglin, 2005

$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (18 ekv, 10 ml, $W=80\%$) lahustati atsetonitriili ja vee segus (10 ml ACN, 10 ml H_2O). Kolb täideti argooniga. Fmoc-Cl (1 ekv, $m=4,32$ g, $n=0,0168$ mol) lahustati atsetonitriilis (100 ml) ning lisati tilkhaaval jäävannil segades hüdrasiini lahusele. Segu segati jäävannil 2h. ACN aurutati rotaatoril ning jääk pesti vaakumfiltrimisel jääkülma vee ning PE-

ga. Saadud ainet kuivatati õhu käes üleöö. Tulemuseks saadi 3,68 g TLC järgi puhast ainet, mis moodustas 86% teoreetilisest saagisest.

Modifitseeritud meetod Fmoc-NHNH₂ sünteesimiseks:

N₂H₄·H₂O (18 ekv, 10 ml, W=80%) lahustati atsetonitriili ja vee segus (10 ml ACN, 10 ml H₂O). Kolb täideti lämmastikuga. Fmoc-Cl (1 ekv, m=4,27 g, n=0,0165 mol) lahustati atsetonitriilis (150 ml) ning lisati tilkhaaval jäävannil segades hüdrasiini lahusele. Segul lasti jäävannil 2h magnetsegajapliidil segada. ACN aurutati rotaatoril kokku. Jääk suspendeeriti jääkülma veega (50 ml) ning pesti vaakumfiltrimisel jääkülma vee ning tolueniga. Saadud ainet kuivatati õhu käes üleöö. Tulemuseks saadi 3,94 g TLC järgi puhast ainet, moodustades 97% teoreetilisest saagisest.

¹H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ: 3,76 (br s; 2H; NH₂); 4,22 (s; 1H; CH(Fmoc)); 4,45 (d; 2H; J=5,6 Hz; CH₂(Fmoc)); 6,04 (br s; 1H; NH); 7,32 (t; 2H; J=7,7 Hz; Ar(H)); 7,41 (t; 2H; J=7 Hz; Ar(H)); 7,57 (d; 2H; J=7,7 Hz; Ar(H)); 7,8 (d; 2H; J=7,7 Hz; Ar(H)). ¹³C δ: 47,2 (CH); 67,3 (CH₂)(Fmoc); 120,1; 125,0; 127,1; 127,8; 141,4; 143,7 (Ar(C)); 158,5 (C=O).

3.4.3 Z-NHNH₂ (15b) süntees

N₂H₄·H₂O (11 ekv, 10 ml, W=80%) lahustati dietüüleetris, millele lisati tilkhaaval bensüülkloroformaati (1 ekv, m=4,242 g, n=0,248 mol) 0°C juures. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril üleöö. Seejärel lahjendati etüülatsetaadis, pesti 1M NaHCO₃ lahusega, veega ning küllastatud NaCl-ga. Vesifaasi ekstraheeriti täiendavalt 3 korda EA-ga ja NaCl lahusega. Orgaaniline faas kuivatati vv NaSO₄-ga, vaakumfiltreeriti ning aurutati rotaatoril kokku. Tulemuseks saadi 4,002 g TLC järgi puhast ainet, moodustades 97% teoreetilisest saagisest. (Mastitski, 2015)

¹H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ: 3,76 (br s; 2H; NH₂); 5,14 (s; 2H; CH₂); 6,03 (br s; 1H; NH); 7,33-7,36 (m; 5H; Ar(H)). ¹³C δ: 67,5 (CH₂); 128,4; 128,5; 128,8; 136,2 (Ar(C)); 158,8 (C=O).

3.4.4 Üldine protseduur bensoüülhüdrasiinide saamiseks

1 ekv metüülbensoaati (n=0,037 mol) lahustati 4 ml etanoolis, lisati 3 ekv 80% N₂H₄·H₂O ning ülejäänud etanool (V=4ml). Segu keedeti püstjahutiga 2h. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga. Reaktsiooni lõppedes eemaldati kuumutus ning lisati tolueni ning PE kerge hägu

tekkeni. Segu jäeti üleöö seisma külmikus. Emalahus eemaldati ning välja filtritud ainet pesti 3 korda PE-ga. Ained **16-18** saadi saagisega 50-82%.

Bensoüülhüdrasiin (16), 50% saagist. ^1H TMR (700 MHz; CDCl_3) δ : 4,15 (s; 2H; NH_2); 7,43-7,45 (m; 2H; Ar(H)); 7,51-7,53 (m; 1H; Ar(H)); 7,63 (s; 1H; NH); 7,75-7,76 (m; 2H; Ar(H)). ^{13}C δ : 126,9; 128,8; 131,9; 132,7 (Ar(C)); 168,7 (C=O).

3-nitrobensoüülhüdrasiin (17), 82% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl_3) δ : 4,17 (s; 2H; NH_2); 7,64 (t; 1H; $J=7,7$ Hz; Ar(H)); 8,27 (d; 1H; $J=7,7$ Hz; Ar(H)); 8,33-8,35 (m; 1H; Ar(H)); 8,80 (d; 1H; $J=8,4$ Hz; Ar(H)); 9,76 (s; 1H; NH). ^{13}C δ : 122,5; 126,0; 129,7; 133,7; 134,7; 148,4 (Ar(C)), 165,5 (C=O).

3,4-dimetoksübensoüülhüdrasiin (18), 54% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl_3) δ : 3,92 (s; 6H; $2\times\text{OCH}_3$); 4,10 (br s; 2H; NH_2); 6,86 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H; Ar(H)); 7,27-7,29 (m; 1H; Ar(H)); 7,38 (d; $J = 2,1$ Hz; 1H; Ar(H)); 7,62 (s; 1H; NH). ^{13}C δ : 55,9 (CH_3); 55,9 (CH_3); 110,28; 110,29; 119,3; 125,1; 149,0; 151,9 (Ar(H)); 168,3 (C=O).

3.4.5 Üldine protseduur kaitstud bensüülhüdrasiinide saamiseks (19a-19k)

1 ekv kaitstud hüdrasiini ($n=0,001$ mol) lahustati 90 % EtOH ($V=5$ ml). Lisati juurde 1,1 ekv atsetaali ($n=0,0011$ mol) ning p-TsOH (0,1 ekv). Seejärel pandi reaktsioonisegu püstjahutiga keema. Reaktsioonikulgu jälgiti TLC-ga. Kui reaktsioon oli lõppenud, roteeriti EtOH kokku, lisati 15 ml tolueni ning roteeriti veel kord kokku. Pärast roteerimist vakumeeriti jääki täiendavalt u 15 min. Jääk lahustati destilleeritud THF-is ($V=4$ ml) ning lisati 3 ekv redutseerijat $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (1M) ($n=0,003$ mol) ja segati 3-12 tundi. Redutseerimisel tekkinud kompleksite lagundamiseks lisati reaktsioonisegule EtOH ($V = 10$ ml) ja keedeti püstjahutiga 2-3 tundi. THF ja EtOH aurutati rotaatoril kokku, jääk vakumeeriti ning kuivatati täiendavalt sügava vaakumi all. Saadud jääk lahustati EA-s ($V=100$ ml), pesti küllastatud NaHCO_3 -ga, $2\times \text{H}_2\text{O}$ -ga ning küllastatud NaCl lahusega. Vesifaasi ekstraheeriti täiendavalt $2\times$ EA-ga. Orgaaniline faas kuivatati vv. NaSO_4 -ga ja vaakumfiltreeriti. Filtraat roteeriti ja vakumeeriti. Aine puhastati kolonnkromatograafiliselt kasutades voolutina EA, Hex:EA/2:1 või EA:PE/1:1 segu. Kaitstud bensüülhüdrasiinide saagised jäid 28-95% vahemikku.

N-Fmoc-N'-bensüülhüdrasiini (FmocNHNHBn) (19a) (Boeglin, 2005), 58% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl_3) δ : 4,00 (s; 2H; CH_2); 4,22 (s; 1H; $\text{CH}(\text{Fmoc})$); 4,45 (s; 2H; $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$); 6,26 (s; 1H; NH); 7,29-7,33 (m; 7H; Ar(H)); 7,40 (t; 2H; $J = 7$ Hz; Ar(H)); 7,55

(d; 2H; J = 4,9 Hz; Ar(H)); 7,76 (d; 2H; J = 7,7 Hz; Ar(H)). ^{13}C δ : 47,2 (CH); 55,6 (CH₂); 66,9 (CH₂(Fmoc)); 120,0; 125,0; 127,1; 127,6; 127,8; 128,5; 129,0; 137,3; 141,3; 143,7 (Ar(C)); 157,1 (C=O).

N-Boc-N'-bensüülhüdrasiini (BocNHNHBn) (19b) (Carpino, 1960), 39% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ : 1,46 (s; 9H; 3xCH₃); 3,97 (s; 2H; CH₂); 4,15 (br s; 1H; NH); 6,30 (s; 1H; NH(C=O)); 7,25-7,34 (m; 5H; Ar(H)). ^{13}C δ : 28,2 (3xCH₃); 55,6 (CH₂); 80,3 (C(CH₃)₃); 127,3; 128,3; 128,8; 137,5 (Ar(C)); 156,5 (C=O).

N-Cbz-N'-bensüülhüdrasiini (CbzNHNHBn) (19c) (Mäeorg, 1999), 46% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ : 3,97 (s; 2H; CH₂); 4,20 (br s; 1H; NH); 5,11 (s; 2H; CH₂(Z)); 6,56 (br s; 1H; NH(Z)); 7,21-7,33 (m; 10H; Ar(H)). ^{13}C δ : 55,5 (CH₂); 66,9 (CH₂(Z)); 127,4; 128,0; 128,1; 128,3; 128,4; 128,8; 135,9; 137,2 (Ar(C)); 157,1 (C=O).

N-bensoüül-N'-bensüülhüdrasiini (BzNHNHBn) (19d) (Gillis, 1967), 72% saagist, ^1H TMR spektrid (700 MHz; CDCl₃) δ : 3,99 (s; 2H; CH₂); 5,18 (br s; 1H; NH); 7,24-7,34 (m; 7H; Ar(H)); 7,43-7,45 (m; 1H; Ar(H)); 7,67-7,68 (m; 2H; Ar(H)); 8,45 (s; 1H; NH(C=O)). ^{13}C δ : 55,8 (CH₂); 126,8; 127,5; 128,4; 128,4; 129,0; 131,7; 132,6; 137,2 (Ar(C)); 167,3 (C=O).

N-(3-nitrobensoüül)-N'-bensüülhüdrasiini((3-NO₂)BzNHNHBn) (19e), 78% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ : 4,03 (s; 2H; CH₂); 5,33 (br s; 1H; NH); 7,19-7,21 (m; 1H; Ar(H)); 7,25 (t; 2H; J = 7,7 Hz; (Ar(H))); 7,30 (d; 2H; J = 7 Hz; Ar(H)); 7,54 (t; 1H; J = 7,7 Hz; Ar(H)); 8,10 (d; 1H; J = 7,7 Hz; Ar(H)); 8,26-8,27 (m; 1H; Ar(H)); 8,59 (s; 1H; Ar(H)); 9,21 (s; 1H; NH(C=O)). ^{13}C δ : 55,8 (CH₂); 122,1; 126,3; 127,8; 128,6; 129,1; 129,9; 133,3; 134,3; 137,1; 148,1 (Ar(C)); 165,1 (C=O).

N-(3,4-dimetoksübensoüül)-N'-bensüülhüdrasiini ((3,4-diOMe)BzNHNHBn) (19f), 65% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ : 3,87 (s; 3H; CH₃); 3,88 (s; 3H; CH₃); 4,05 (s; 2H; CH₂); 4,84 (br s; 1H; NH); 6,77-6,85 (m; 1H; Ar(H)); 7,18-7,36 (m; 6H; Ar(H)); 7,55-7,63 (m; 1H; Ar(H)); 8,02 (s; 1H; -C(=O)NH). ^{13}C δ : 55,8 (CH₂); 55,9; 56,0 (OCH₃); 110,3; 110,4; 119,9; 125,3; 127,6; 128,5; 129,1; 137,4; 148,8; 151,9 (Ar(C)); 167,1 (C=O).

N-Fmoc-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini (FmocNHNH(p-NO₂)Bn) (19g), 68% saagist, ^1H TMR (200 MHz; CDCl₃) δ : 4,03 (s; 2H; CH₂); 4,17 (t; 1H; J = 6,2 Hz; CH); 4,46 (s; 2H; CH₂(Fmoc)); 6,47 (s; 1H; NH); 7,24-7,53 (m; 9H; Ar(H)); 7,7 (d; J = 7,6 Hz; 2H; Ar(H));

8,07-8,14 (m; 3H; Ar(H)). ^{13}C δ : 47,0 (CH); 54,4 (CH₂); 66,7 (CH₂(Fmoc)); 119,8; 123,3; 123,4; 124,6; 126,7; 126,9; 127,6; 129,2; 141,1; 143,3; 145,0; 147,1; 148,1 (Ar(C)); 157,0 (C=O).

N-Cbz-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini (CbzNHNH(p-NO₂)Bn) (19h), 55% saagist, ^1H TMR (200 MHz; CDCl₃) δ : 4,09 (s; 3H; CH₂+NH); 5,11 (s; 2H; CH₂(Z)); 6,23 (s; 1H; NH); 7,32-7,51 (m; 7H; Ar(H)); 8,12 (t; 2H; J = 8,4 Hz; Ar(H)). ^{13}C δ : 54,7 (CH₂); 67,1 (CH₂(Z)); 126,8; 128,0; 128,2; 128,4; 129,3; 135,7; 145,1; 147,2; 148,6 (Ar(C)); 157,2 (C=O).

N-bensoüül-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini (BzNHNH(p-NO₂)Bn) (19i), 60% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ : 4,20 (s; 2H; CH₂); 5,31 (s; 1H; NH); 7,41 (t; 2H; J = 7,7 Hz; Ar(H)); 7,48-7,50 (m; 1H; Ar(H)); 7,64 (d; 1H; J = 8,4 Hz; Ar(H)); 7,8 (d; 2H; J = 7,7 Hz; Ar(H)); 8,19 (d; 2H; J = 8,4 Hz; Ar(H)); 9,70 (s; 1H; NH). ^{13}C δ : 55,0 (CH₂); 123,3; 127,3; 128,4; 129,5; 131,6; 132,8; 146,0; 147,1 (Ar(C)); 167,2 (C=O).

N-(3-nitro)-bensoüül-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini ((3-NO₂)BzNHNH(p-NO₂)Bn) (19j), 28% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ : 4,25 (s; 2H; CH₂); 5,24 (s; 1H; NH); 7,60 (d; 2H; J = 8,4 Hz; Ar(H)); 7,67 (t; 1H; J = 7,7 Hz; Ar(H)); 7,74 (s; 1H; Ar(H)); 8,07 (d; 1H; J = 7,7 Hz; Ar(H)); 8,22 (d; 2H; J = 8,4 Hz; Ar(H)); 8,38-8,40 (m; 2H; Ar(H)); 8,55 (t; 1H; J = 2,1 Hz; NH). ^{13}C δ : 54,9 (CH₂); 121,7; 123,6; 126,5; 129,3; 129,9; 132,7; 133,8; 144,7; 147,4; 148,1 (Ar(C)); 165,3 (C=O).

N-(3,4-dimetoksübensoüül)-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini ((3,4-diOMe)BzNHNH(p-NO₂)Bn) (19k), 57% saagist, ^1H TMR (700 MHz; CDCl₃) δ : 3,91 (s; 3H; OCH₃); 3,91 (s; 3H; OCH₃); 4,20 (s; 2H; CH₂); 5,14 (br s; 1H; NH); 6,83 (d; 1H; J = 8,4 Hz; Ar(H)); 7,17-7,19 (m; 1H; Ar(H)); 7,36 (d; 1H; J = 2,1 Hz; Ar(H)); 7,58 (d; 3H; J = 8,4 Hz; Ar(H)+C(=O)NH); 8,20 (d; 2H; J = 9,1 Hz; Ar(H)). ^{13}C δ : 55,1 (CH₂); 56,0; 56,0 (OCH₃); 110,3; 110,4; 119,3; 123,7; 124,8; 129,6; 145,4; 147,4; 149,2; 152,3 (Ar(C)); 167,5 (C=O).

4. Tulemused ja nende arutelu

4.1 4-nitrobensaaldiatsetaadi süntees (14)

Skeem: vt 3.3.1

CrO_3 lahuse valmistamisel lisati kroomtrioksiidi väikeste portsjonite kaupa jahutatud atseetanhüdriidile plahvatusohtliku olukorra vältimiseks.

Kogu süntees viidi läbi jahutusvannil, kuna tegemist oli tugevalt eksotermilise reaktsiooniga. Jahutusvannina kasutati isopropüülalkoholi ja vedela lämmastiku segu, kuna see aitas saavutada madalamat temperatuuri. Kroom(VI)oksiidi lahuse aeglane lisamine ja hoolikas temperatuuri kontrollimine võimaldas vältida reaktsiooni liiga eksotermilist kulgemist ning üleoksüdeerumist.

2h pikkuse segamise järel kallati segu keeduklaasi, mis oli 1/3 osas täidetud purustatud jääga ülekuumenemise vältimiseks. Aine eraldus peene hõljumina. Seda eraldati vaakumfiltrimisel, pesti jääki vee, küllastatud NaHCO_3 -ga p-nitrobensoehappe eemaldamiseks ning EtOH-ga.

Saagiseks määrati 37% teoreetilisest. Suhteliselt madal saagis on tingitud hetkelisest reaktsioonisegu ülekuumenemisest, mis juhtus ülekandmisel keeduklaasi. Reaktsioonisegu jahutati jää lisamisega. Jääd lisati senikaua, kuni segu oli jahtunud ning kallati seejärel kiiresti jääga täidetud keeduklaasi. Selline järsk temperatuuri muutus põhjustas ulatusliku oksüdatsiooni ning saagise kadu.

4.2 Fmoc-hüdrasiini (Fmoc-NHNH₂) (15a) ja Z-hüdrasiini (Z-NHNH₂) (15b) süntees

Skeem: vt 3.3.2

Antud sünteesis kasutati suurt hüdrasiinhüdraadi ülehulka mitmel põhjusel. Esiteks, reaktsiooni paremaks kulgemiseks ning mono-kaitstud produkti tekke eelistamiseks. Teiseks, seob hüdrasiinhüdraat tekkiva vesinikkloriidi moodustades hüdrasiinvesinikkloriidi. Kolmandaks, hüdrasiin on õhuhapniku toimetel kergesti oksüdeeruv. Antud sünteesis täheldati õrna roosakat värvust, mis viitab oksüdeerunud produktidele.

Fmoc-kloriidi/bensüükloroformaati lisati tilkhaaval kõrvalreaktsioonide vältimiseks. Tegemist oli eksotermilise reaktsiooniga. Temperatuuri suurenemisest tingitud di-kaitstud ühendi tekke vältimiseks kasutati kogu sünteesi vältel segu jahutamist jäävannil.

Homogeenses keskkonnas töötamiseks kasutati hüdrasiinhüdraadi lahustamiseks ACN:H₂O/1:1 segu ning Fmoc-kloriidi jaoks ACN-i. Z-hüdrasiini puhul kasutati DE keskkonda.

Fmoc-hüdrasiini puhastamiseks suspendeeriti ainet jääkülmas vees, filtreeriti ja pesti 3 korda jääkülma veega, et eemaldada ülehulgas olevat hüdrasiini ja soola. Seejärel pesti PE või toluleeniga üleliigse vee ja apolaarsete kõrvalproduktide eemaldamiseks.

Fmoc-hüdrasiini sünteesi teostati kahel korral. Esimeses katses pesti filtrimisel saadud ainet PE-ga ning teises toluleeniga. Saagised moodustasid teoreetilisest vastavalt 86% ning 97%. Teise katse suurema saagise põhjuseks võib olla pesemine Tol-ga ning jääkülma vee kasutamine, mis ei lahusta Fmoc-hüdrasiini ega vii läbi filtri lahusesse. Ühtlasi võimaldab toluleeniga pesemine paremini vabaneda veest.

Z-hüdrasiini puhastamiseks lahustati aine EA-s ning pesti orgaanilist faasi 3x veega hüdrasiini ja tema soolade eemaldamiseks. Vesifaasi ekstraheeriti mõned korrad EA-ga, et saada vesifaasist täiendavat Z-hüdrasiini kogust. Toorprodukt oli TLC järgi puhas.

4.3 Bensoüülhüdrasiinide (16-18) süntees

Skeem: vt 3.3.3

Bensoüülhüdrasiini sünteesil kasutati hüdrasiinhüdraati 3-kordses ülehulgas võrreldes metüülbensoaadiga. Lähteaine ülehulk ja püstjahutiga keetmine olid vajalikud reaktsiooni täielikumaks ning kiiremaks kulgemiseks. Saadud produkti puhastamiseks kristalliti produkt otse reaktsioonisegust. Selleks lisati Tol-i kerge hägu tekkeni, jahutati toatemperatuurini ja seejärel hoiti külmikus üle öö. Produktide saagiseks tuli 50-82%. Kõik ained olid TLC järgi puhtad.

4.4 Kaitstud bensüülhüdrasiinide (19a-19k) süntees

Skeem: vt 3.3.4

Kaitstud bensüülhüdrasiinide saamiseks kasutati kuue erineva kaitserühmaga hüdrasiine. Viidi nendega läbi katsete seeriad dimetoksümetüülbenseeni ja p-nitrobensaaldiatsetaadiga. Atsetaale võeti väikeses ülehulgas, et tagada reaktsiooni lõpuni kulgemist. Solvendina kasutati EtOH/H₂O (90%), mis on polaarne, soodustab kaitstud-hüdrasiinide lahustumist ning

stabiliseerib erinevad karbokatioonseid vaheühendeid, mis selles segus moodustuvad ning mille üle kondensatsioon käib.

Reaktsioonikiiruses märgati suurt erinevust. Dimetoksümetüülbenseeniga kulges kondensatsioonireaktsioon püstjahutiga keetmisel lõpuni 0,5-1h. P-nitrobensaaldiatsetaadiga oli vajalik pikem aeg (isegi 10h) ning vaatamata sellele ei õnnestunud reaktsioone lõpuni viia.

Kondensatsioonietapile järgneval täiendaval roteerimisel kasutati tolueni, et segust võimalikult palju vett eemaldada.

Antud töös viidi läbi katsed töödeldud THF-ga. Katsete jaoks destilleeriti THF lihtdestillatsioonil või rotaatoril kuivaks, kuid sellega võisid kaasneda probleemid redutseerimisel. Hüdrasooni redutseerimine ei kulgenud korralikult lõpuni ning segusse jäi hüdrasooni lisand, mida oli kolonnitamisel raske eemaldada. Fraktsioonid tulid ülekattumisega ning sellest tulenevalt tegeliku saagise vähenemine. Võib arvata, et destilleerimata THF-s sisalduv vähene niiskus on antud reaktsioonis katalüsaatoriks ning soodustas redutseerimist. Hüdrasooni lisandist lahti saamiseks prooviti korduvat kolonnitamist ning ümberkristallimist. Oodatud tulemusi andis ümberkristallimine.

Aine **19f** eksperimenti teostati kaks korda, kuna kolonnitamisel valiti esimesel korral ebasobiva polaarsusega eluent (Hex:EA/1:1) ning sai korjatud vale fraktsioon. Korduskatsel valiti eluendiks puhas EA, kuna produkt on üsnagi polaarne.

Reaktsioonides 4-nitro-bensaaldiatsetaadiga täheldati just Fmoc- ja Z-kaitserühmaga hüdrasiinide puhul mingit lisandit, mis liigub kolonnis koos vajaliku ainega. TLC järgi on ained puhtad, kuid TMR-i spektritest on näha, et lisand on sees. Hetkel ei ole teada, millega on tegu, kuid sellega tegeletakse edasi. Bensoüül- ja asendatud bensoüülrühmaga hüdrasiinide puhul sellise lisandi teket ei täheldatud.

Algses asa-metioniini sünteesi käsitlevas protseduuris (vt 2.3) kasutatud TFA oli välja vahetatud TsOH vastu, mis ei ole lenduv ning on kergemini doseeritav.

5. Kokkuvõte

Redutseeriva alküülimisega kaasneva konjugeeritud C=N sidemega ühendite probleemse redutseerimise ja alküülrühma kahes etapis sisestamise mugavamaks muutmiseks arendati edasi ühe-poti sünteesimeetodit, mis võimaldaks kasutada lähteainetena stabiilsemaid atsetaal- ja diatsetoksü-kaitstud bensaldehüüde. Teiseks nõudeks oli vältida karbonüülühendi kaitserühma mahavõtmist eraldi etapis.

Uurimuse käigus teostati mitu katsete seeriat kasutades lähteainetena 6 erinevat kaitstud hüdrasiini, bensaldehüüdi dimetüülatsetaali ning esmakordselt sisestati reaktsiooni kaitstud hüdraasiinidega (4-nitro)-bensaaldiatsetaati.

Tehniliselt raskendatud ning väärismetalli katalüüsi vajava redutseerimise asemel rakendati saadud hüdrasoonide taandamiseks $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, mis võimaldas selektiivselt redutseerida konjugeeritud C=N sidet teiste funktsionaalrühmade juuresolekul.

Lisaks vahetati välja algselt kasutuses olnud TFA p-TsOH vastu, mis võimaldas happelise katalüsaatori kergemat doseerimist. Produktide saagised olid vahemikus 28-95% ning neid on võimalik parandada edaspidise optimisatsiooni käigus. Antud töö käigus sünteesiti arendatud meetodit kasutades 11 ainet, millest 7 olid esmakordselt sünteesitud:

N-(3-nitro)-bensoüül-N'-bensüülhüdrasiin

N-(3,4-dimetoksü)-bensoüül-N'-bensüülhüdrasiin

N-(3,4-dimetoksü)-bensoüül-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiin

(3-nitro)-bensoüül-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiin

N-bensoüül-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiin

N-Z-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiin

N-Fmoc-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiin

Antud töö tulemusena loodi mugav ja kiire meetod kaitstud bensüül- ning asendatud bensüülhüdrasiinide saamiseks, mis võimaldas kasutada lähteainetena nii bensaldehüüdi atsetaali kui ka diatsetaati ning vältida karbonüülühendi kaitserühma mahavõtmist eraldi etapis.

Selle töö tulemused avaldatakse publikatsioonina teadusajakirjas.

6. Summary

One-pot synthesis to obtain protected benzylhydrazines

Bachelor thesis by Siret Niinepuu

Reductive alkylation of hydrazines is complicated by difficulties with reduction of conjugated C=N bond. Also this method needs two synthetic steps to insert an alkyl group. Due to these difficulties there was a need for convenient procedure which would allow to use benzaldehydes in their stabile acetal or diacetoxo-protected form and to avoid a deprotection of carbonyl compound in separate synthetic step.

In this research 6 different protected hydrazines were tested in reactions with benzaldehyde dimethyl acetal and (4-nitro)-benzaldiacetate. To avoid technically complicated and precious metal catalyzed reductions of obtained hydrazones $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ was applied as a reductive reagent. This reductant selectively reduced hydrazones in the presence of other functional groups.

Additionally, TFA was exchanged to p-TsOH which enabled easier dosing of the acidic catalyst. Yields of separated products were 28-95%, which could be improved by further optimization. During this study 11 compounds were synthesized 7 of them were not prepared previously:

N-(3-nitro)-benzoyl-N'-benzylhydrazine

N-(3,4-dimethoxy)-benzoyl-N'-benzylhydrazine

N-(3,4-dimethoxy)-benzoyl-N'-(p-nitro)-benzylhydrazine

(3-nitro)-benzoyl-N'-(p-nitro)-benzylhydrazine

N-benzoyl-N'-(p-nitro)-benzylhydrazine

N-Z-N'-(p-nitro)-benzylhydrazine

N-Fmoc-N'-(p-nitro)-benzylhydrazine

In summary a convenient and quick method for syntheses of protected benzyl and substituted benzylhydrazines was developed. This method enabled to use benzaldehyde dimethyl acetal and (4-nitro)-benzaldiacetate as a substrates, to avoid deprotection of carbonyl group in the additional step as well as to facilitate the reduction of conjugated hydrazones.

The results will be published as a part of scientific article.

Tänuavaldus

Soovin tänada oma juhendajat Anton Mastitskit, kes usaldas mind omaalgatatud ühe-poti sünteesidega tegelema ning aitas nõu ja jõuga nii eksperimentide läbiviimisel kui ka diplomi töö valmimisel.

Täna orgaanilise keemia professor Jaak Järve, kes juhatas mind koostööle Antoniga.

Suurimad tänud lähevad minu vanematele ja teistele lähedastele pereliikmetele. Ilma nende toetuseta ei oleks ma täna seda eluetappi lõpetamas.

Suured austus- ja tänusõnad!

Kasutatud kirjandus

1. Jakubke, H.-D.; Jeschkeit, H. *Аминокислоты, пептиды, белки*, Москва, „Мир“, 1985.
2. Holmes, C. L.; Landry, D. W.; Granton, J. T. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 – clinical physiology. *Critical Care*. **2004**, 8, 1, 15-23.
3. Dalayeun, J. F.; Nores, J. M.; Bergal, S. Physiology of β -endorphins. A close-up view and a review of the literature. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **1993**, 47, 8, 311-320.
4. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*, CRC Press LLC: Blvd., N.W., Boca Raton, Florida, 1997.
5. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 14, 2149-2154.
6. Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino acids. *J. Chem. Soc. Commun.*, **1978**, 537-539.
7. Rich, D. H.; Singh, J. in *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol.1, *Major Methods of Peptide Bond Formation*, Gross, E. and Meienhofer, J. Academic Press, New York, 241, 1979.
8. Williams, A.; Ibrahim, T. Carbodiimide chemistry: recent advances. *Chem. Rev.* **1981**, 81, 6, 589-636.
9. Mastitski, A.; Järv, J. One-pot Synthesis of Fmoc- and Boc-Protected Aza-Methionine Precursors from 2-Methylthioacetaldehyde Dimethyl Acetal. *Organic Preparations and Procedures International*. **2014**, 46, 559-564.
10. Furr, B. J. A.; Valcaccia, B. E.; Hutchinson, F. G. *Br. J. Cancer*. **1983**, 48, 140-141.
11. Melendez, R. E.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scan for Rapid Identification of Secondary Structure Based on the Application of N-Boc-Aza¹-Dipeptides in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6759-6764.
12. Bolla, M.; Gonzalez, D.; Warde, P.; Dubois, J. B.; Mirimanoff, R.-O.; Storme, G.; Bernier, J.; Kuten, A.; Sternberg, C.; Gil, T.; Collette, L.; Pierart, M. Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *The New England Journal of Medicine*. **1997**, 337, 5, 295-300.
13. Mashkovsky, M. D. *Medicines: Pharmacotherapy for doctors, manual: 2 parts*, 1993.

14. Gentilucci, L.; De Marco, R.; Cerisoli, L. Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 28, 3185-3203.
15. Busnel, O.; Bi, L.; Dali, H.; Cheguillaume, A.; Chevance, S.; Bondon, A.; Muller, S.; Baudy-Floc'h, M. Solid-phase synthesis of „mixed“ peptidomimetics using Fmoc-protected Aza- β^3 -amino acids and α -amino acids. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 26, 10701-10708.
16. Cheloha, R. W.; Maeda, A.; Dean, T.; Gardella, T. J.; Gellman, S. H. Backbone modification of a polypeptide drug alters duration of action *in vivo*. *Nature Biotechnology.* **2014**, 32, 7, 653-656.
17. Mastitski, A.; Haljasorg, T.; Kipper, K.; Järv, J. Synthesis of aza-phenylalanine, aza-tyrosine, and aza-tryptophan precursors via hydrazine alkylation. *Proc. Est. Ac. Sci.*, **2015**, 64, 2, 168-178.
18. Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T. Synthesis of azapeptides by the Fmoc/*tert*-butyl/polyamide technique. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1993**, 1, 2843-2849.
19. Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-amino acid scanning of secondary structure suited for solid-phase peptide synthesis with Fmoc chemistry and aza-amino acids with heteroatomic side chains. *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 6, 864-878.
20. Proulx, C.; Sabatton, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; Ramos, Y. G.; Lubell, W. D.; Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Med. Chem.* **2011**, 3, 9, 1139-1163.
21. Zhang, W. J.; Berglund, A.; Kao, J. L.-F.; Couty, J. P.; Gershengorn, M. C.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5, 1221-1235.
22. Lee, H. J.; Song, J. W.; Choi, Y. S.; Park, H. M.; Lee, K. B. A theoretical Study of Conformation Properties of N-Methyl Azapeptide Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 40, 11881-11893.
23. Nowick, J. S.; Powell, N. A.; Nguyen, T. M.; Noronha, G. An improved method for the synthesis of enantiomerically pure amino acid ester isocyanates. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 26, 7364-7366.
24. Ragnarsson, U. Synthetic methodology for alkyl substituted hydrazines. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 205-213.
25. Garcia-Ramos, Y.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Synthesis of hydrazine and azapeptide derivatives by alkylation of carbazates and semicarbazones. *Can. J. Chem.* **2012**, 90, 985-993.

26. Bourguet, C. B.; Proulx, C.; Klocek, S.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. Solution-phase submonomer diversification of aza-dipeptide building blocks and their application in aza-peptide and aza-DKP synthesis. *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 6, 284-296.
27. Sabatino, D.; Proulx, C.; Klocek, D.; Bourguet, C. B.; Boeglin, D.; Ong, H.; Lubell, W. D. Exploring Side-Chain Diversity by Submonomer Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2009**, 11, 16, 3650-3653.
28. Calabretta, R.; Gallina, C.; Giordano, C. Sodium cyanoborohydride reduction of (benzyloxycarbonyl)-and (tert-butoxycarbonyl) hydrazones. *Synthesis*. **1991**, 536-539.
29. Sigma Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/finland.html> viimati alla laetud 17.05.2016.
30. Nishimura, T. O- and p-nitrobenzaldiacetate. *Org. Synth.* **1956**, 36, 58
31. Carpino, L. A.; Santilli, A. A.; Murray, R. W. Oxidative reactions of hydrazines. V. Synthesis of monobenzyl 1,1-disubstituted hydrazines and 2-amino-2,3-dihydro-1H-benz[de]isoquinoline. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 11, 2728-2731.
32. Mäeorg, U.; Pehk, T.; Ragnarson, U. Synthesis of substituted hydrazines from triprotected precursors. *Acta Chemica Scandinavica*. **1999**, 53, 12, 1127-1133.
33. Gillis, B. T.; Kadunce, R. E. Acylated hydrazine mustards. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 32, 1, 91-94.

Infoleht

Antud töö tulemusena loodi mugav ja kiire meetod kaitstud bensüül- ning asendatud bensüülhüdrasiinide saamiseks, mis võimaldas kasutada lähteainetena nii bensaldehüüdi atsetaali kui ka diatsetaati ning vältida karbonüülühendi kaitserühma mahavõtmist eraldi etapis.

Märksõnad: peptiid, asa-peptiid, hüdrasiin, kaitstud hüdrasiin, bensüülhüdrasiin, atsetaal, hüdrasiinide alküülimine, redutseeriv alküülimine, ühe-poti süntees.

Infosheet

In summary a convenient and quick method for syntheses of protected benzyl and substituted benzylhydrazines was developed. This method enabled to use benzaldehyde dimethyl acetal and (4-nitro)-benzaldiacetate as a substrates, to avoid deprotection of carbonyl group in the additional step as well as to facilitate the reduction of conjugated hydrazones.

Key words: peptide, aza-peptide, hydrazine, protected hydrazine, benzylhydrazine, acetal, alkylation of hydrazines, reductive alkylation, one-pot synthesis.

Lisa

TMR spektrid

Aine nimetus	Aine kood
4-nitrobensaaldiatsetaat	14
Fmoc-hüdrasiin	15a
Z-hüdrasiin	15b
Bensoüülhüdrasiin	16
3-nitrobensoüülhüdrasiin	17
(3,4-dimetoksü)-bensoüülhüdrasiin	18
N-Fmoc-N'-bensüülhüdrasiin	19a
N-Boc-N'-bensüülhüdrasiin	19b
N-Cbz-N'-bensüülhüdrasiin	19c
N-Bz-N'-bensüülhüdrasiin	19d
N-(3-nitro)-N'-bensüülhüdrasiin	19e
N-(3,4-dimetoksü)-N'-bensüülhüdrasiin	19f
N-Fmoc-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiin	19g
N-Cbz-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini	19h
N-Bz-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini	19i
N-(3-nitro)-bensoüül-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiini	19j
N-(3,4-dimetoksübensoüül)-N'-(p-nitro)-bensüülhüdrasiin	19k

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Siret Niinepuu,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Ühe-poti sünteesimeetod kaitstud bensüülhüdrasiinide saamiseks“,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Anton Mastitski,

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni 03.06.2017 autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016